



TITLE:

Efficient and robust differentiation of endothelial cells from human induced pluripotent stem cells via lineage control with VEGF and cyclic AMP(Abstract_要旨)

AUTHOR(S):

Ikuno, Takeshi

CITATION:

Ikuno, Takeshi. Efficient and robust differentiation of endothelial cells from human induced pluripotent stem cells via lineage control with VEGF and cyclic AMP. 京都大学, 2017, 博士(医学)

ISSUE DATE:

2017-09-25

URL:

<https://doi.org/10.14989/doctor.k20663>

RIGHT:

京都大学	博士（ 医 学）	氏 名	幾野 毅
論文題目	Efficient and robust differentiation of endothelial cells from human induced pluripotent stem cells via lineage control with VEGF and cyclic AMP（VEGF 及び cyclic AMP 投与による分化制御を利用したヒト iPS 細胞からの高効率かつ高収量な血管内皮細胞分化誘導法の開発）		
（論文内容の要旨）			
<p>【背景】ヒト iPS 細胞の再生医療への応用においては、高純度な血管内皮細胞を多量に得られる分化誘導法の確立が望まれる。これまで報告されている、マウス ES 細胞における、2 型血管内皮細胞増殖因子（VEGF）受容体陽性の中胚葉細胞を共通の前駆細胞とした心血管系細胞の系統的分化誘導法においては、VEGF が血管内皮細胞の分化に必須であり、さらに 8-bromo cyclic adenosine monophosphate (cAMP)が血管内皮細胞への分化を増強することが示されている。一方、ヒト iPS 細胞においては、中胚葉細胞を介した心筋細胞の効率的で高収量な分化誘導法が報告されている。双方の結果を踏まえ、ヒト iPS 細胞由来中胚葉細胞に VEGF と cAMP を作用させることで、血管内皮細胞分化の効率化を試みた。</p> <p>【方法】ヒト iPS 細胞の無血清二次元単層培養系における中胚葉細胞誘導期に、VEGF と cAMP の濃度や期間を調節しつつ作用させ、分化誘導 9 日目にフローサイトメトリーで血管内皮カドヘリン(VE-Cadherin)陽性の血管内皮細胞の誘導効率および収量を測定した。</p> <p>【結果】分化誘導 4 日目の中胚葉期から 9 日目まで VEGF （100ng/ml）を、4-6 日目に cAMP （1mM）を加えた群（刺激誘導法）において、VEGF 単独投与や非投与と比較して血管内皮細胞が高率に誘導された[56.2±12.5 vs 11.8±7.2（VEGF 単独） vs 2.3±2.4%（非投与）、P<0.001、n=4]。得られた誘導血管内皮細胞数も VEGF と cAMP 投与を前述の濃度および期間で投与した群で最も多かった（1.66±0.70×10⁵ vs 4.9±3.3×10⁴ vs 9.8±10.4×10³ 細胞/cm², P<0.01, n=4）。分化誘導 9 日目に VE-Cadherin 陽性細胞を蛍光励起セルソーターで純化すると、VE-Cadherin と 1 型血小板内皮細胞接着分子の二重陽性細胞が 99%以上を占める純粋な血管内皮細胞が得られた(1iPS 細胞からの血管内皮細胞数 0.79±0.35)。さらに誘導効率を上げるために、VEGF および cAMP の刺激に非応答性の細胞を除外することによる効果を検討した。VEGF および cAMP 投与 2 日後（分化誘導 6 日目）に 2 型 VEGF 受容体陽性中胚葉細胞のみを純化し再培養する過程を加えたところ（刺激-除外誘導法）、分化誘導 9 日目には、99%以上の細胞が血管内皮細胞に誘導された。血管内皮細胞の収量は刺激誘導法と比較して約 4 倍に増加した(1iPS 細胞からの血管内皮細胞数 4.20±0.83)。分化誘導 9 日目の動脈内皮細胞マーカーの ephrinB2 の遺伝子発現は臍帯動脈内皮細胞（HUAECs）より 13.5 倍高かったが、その後 14 日目には HUAECs と同程度まで低下した。一方、静脈内皮細胞マーカーの COUP-TFII は 14 日目に臍帯静脈内皮細胞と同程度に上昇した。この純化血管内皮細胞は、市販の血管内皮細胞用培地を用いて培養すると 5 日間で約 2.5 倍</p>			

に増殖した。またこの純化血管内皮細胞は 2 か月にわたる長期培養と凍結保存が可能であった。			
【結語】血管内皮細胞分化に関わる分子である VEGF と cAMP を誘導の時期に応じて用いることで、高純度な内皮細胞を多量に得ることに成功した。これらの結果は血管を標的とした再生医療や疾患モデルを用いた創薬研究における有望な技術基盤になり得る。			
（論文審査の結果の要旨）			
近年の再生医療における臓器形成過程では、移植細胞／組織の生着効率の改善や機能獲得において血管内皮細胞の存在が重要と考えられている。また、内皮細胞を標的とした疾患モデルによる創薬研究にも注目が集まっている。			
本研究では効率的かつ高純度なヒト iPS 細胞からの内皮細胞分化誘導法の確立を目的とした。まず、ヒト iPS 細胞から中胚葉誘導因子により中胚葉細胞を分化誘導した。誘導中胚葉細胞に、内皮細胞への分化を促進する VEGF と、VEGF 受容体の発現を増強するとされる cAMP の誘導体 8 bromo-cAMP を添加したところ、誘導された細胞の 56%は内皮細胞に分化した。さらに、内皮分化刺激に非応答性の細胞を分化の中間段階において除くことにより誘導細胞の 99%が内皮細胞に分化した。内皮細胞収量は 1 個の iPS 細胞から 11.1 個となり、既報の 3 倍以上に改善した。誘導された内皮細胞は、CD31 や VE-Cadherin といった内皮細胞特異的マーカーを発現しており、tube formation や LDL 取り込みなどの内皮細胞機能を認めた。これらの内皮細胞は、誘導早期においては動脈内皮細胞の表現型を示した。また、やや幼弱な内皮細胞であると考えられた。			
以上のヒト iPS 細胞からの高効率かつ高収量な内皮細胞分化誘導法は、幹細胞移植による再生医療や血管を標的とした疾患モデルを用いた創薬研究における有望な技術基盤となり得る。			
したがって、本論文は博士（ 医学 ）の学位論文として価値あるものと認める。			
なお、本学位授与申請者は、平成 29 年 7 月 28 日実施の論文内容とそれに関連した試問を受け、合格と認められたものである。			
要旨公開可能日： 年 月 日以降			